บทที่ 19

ห้องปฏิบัติการเพื่อการวิจัยพรีออนในสัตว์
(Laboratory Diagnosis of Prion Disease in Animal)

สุจิรา ปาจริยานนท์

พรีออน (Prion หรือ Proteinaceous infection particles) เป็นโปรตีนก่อโรค มีผลทำลายระบบประสาทของมนุษย์และสัตว์ มีรายงานก่อโรคสมองฝ่อหรือโรคครอยท์เฟลด์-เจคอบ (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) ในคน โดยพบในอัตราการเกิดประมาณ 1 ในล้านคน โรคนี้มีการทำลายสมองของผู้ป่วยอย่างช้าๆ กินเวลานานหลายเดือนหรือหลายปี อาการที่พบคือ สติปัญญาเสื่อมลง ควบคุมการเคลื่อนไหวลำบาก และเสียชีวิตในที่สุด พบลักษณะพยาธิสภาพเนื้อสมองจะมีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (spongiform encephalopathy) สำหรับในสัตว์พบโรคสแครปี (Scrapie) ในแพะและแกะ และโรควัวบ้า (Mad cow Disease) หรือที่เรียกว่า Bovine spongiform encephalopathy (BSE) ซึ่งโรควัวบ้ามีรายงานการระบาดในประเทศอังกฤษ จากความรุนแรงของการก่อโรค ของพรีออนทำให้จำเป็นต้องมีการพิจารณาการเลือกใช้ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับต่างๆ กัน และข้อควรปฏิบัติสำหรับห้องปฏิบัติการวินิจฉัยหรือวิจัยพรีออน เพื่อให้เกิดความปลอดภัยทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

พรีออนเป็นโปรตีนปกติที่สร้างจากยีน (gene) ของมนุษย์และสัตว์ ถ้าอยู่ในรูปปกติ (alpha helix) จะไม่ก่อโรค โปรตีนพรีออนปกติเรียกว่า cellular prion protein (PrP^{c}) โปรตีนนี้พบในเซลล์สมองและเซลล์หลายชนิดในร่างกาย เมื่อยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนผิดปกติทำให้การเรียงตัวของกรดอะมิโนผิดไป (fold incorrectly) เปลี่ยนเป็นรูป beta sheet plate โปรตีนของพรีออนที่ก่อโรคแยกได้จากสมองแกะเป็นโรคเรียกว่า Scrapie prion particle (PrP^{sc}) ซึ่งถือว่าเป็นต้นแบบของการเกิดโรคจากพรีออน พรีออนจะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปเมื่อผ่านตัวอย่างในสัตว์ทดลอง จากการทดลองพบว่า พรีออนจากคนเมื่อผ่านหนูทดลองแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกการก่อโรค โดยลดความรุนแรงลง แต่ถ้าพรีออนจากหนูผ่านเข้าในหนูทดลองจะเพิ่มความรุนแรงมากขึ้น โรคนี้ติดต่อสู่คนโดยการรับประทานอาหารที่มีพรีออนจากวัวที่เป็นโรค และยังมีรายงานก่อโรคสมองเสื่อมในคนและสัตว์อื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 19.1

ห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวินิจฉัยและวิจัยสำหรับพรีออนหรือเนื้อเยื่อที่มีพรีออนเป็นเรื่องน่าสนใจ เนื่องจากการจัดให้อยู่ในกลุ่มใดยังมีหลายแนวความคิด หรือการทำลายที่ต้องใช้วิธีการเฉพาะเจาะจง ทำให้ต้องมีการพิจารณาอย่างรอบคอบทั้งในด้านการปฏิบัติงานและการป้องกันสู่สิ่งแวดล้อม ตัวอย่างพรีออนจากคนซึ่งป่วยด้วยโรคสมองเสื่อม พบความเข้มข้นของพรีออนมากสุดในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system, CNS) ประกอบด้วยสมองและไขสันหลัง นอกจากนั้นยังพบในน้ำไขสันหลัง ปอด ตับ ไต ม้าม ต่อมน้ำเหลือง มดลูก ส่วนอื่นๆ ของสมองหรือไขสันหลัง หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ ตัวอย่างพรีออนจากคนป่วยต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 (Biosafety laboratory level, BSL-3) ส่วนพรีออนของโรควัวบ้า เช่น ส่วนสมองหรือไขสันหลัง หรือเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่มีพรีออน แนะนำให้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติ

การชีวนิรภัยระดับ 2 (BSL-2) ขึ้นไป แต่เนื่องจากโรควัวบ้าสามารถติดต่อสู่คนได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 ส่วนพรีออนของสัตว์อื่นๆ พิจารณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 2 ได้ อย่างไรก็ตามตัวอย่างพรีออนเมื่อผ่านเข้าสัตว์ทดลอง ควรมีการพิจารณาและปฏิบัติตามคำแนะนำของชนิดของตัวอย่างพรีออนที่มาจากสัตว์ทดลองนั้นๆ สำหรับโรคซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะมาจากการกินอาหารที่มีพรีออนในสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น สัตว์จำพวกกวาง (Chronic wasting disease, CWD) ตัวมิ้งค์ (Transmissible mink encephalopathy, TME) ในแมว (Feline spongiform encephalopathy, FSE) และสัตว์จำพวกม้าลา (Exotic ungulate encephalopathy, EUE) และโรคอื่นๆ นั้น มีรายละเอียดการใช้ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 19.1

การพิจารณาการใช้ห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยสำหรับงานพรีออนยังประกอบด้วยปัจจัยอื่นๆ เช่น การประเมินความเสี่ยง ซึ่งขึ้นกับชนิดตัวอย่างและปริมาณพรีออน นอกจากนั้นต้องคำนึงถึงระบบการจัดการและวิธีปฏิบัติงาน

ตัวอย่างตรวจที่เก็บในฟอร์มาลีน (formalin) กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) หรือฟาราฟีน (parafin) โดยเฉพาะส่วนสมอง พบว่าสามารถคงสภาพการติดเชื้อได้นาน ดังนั้นควรปฏิบัติงานโดยเสมือนว่าเป็นตัวอย่างสดในทุกขั้นตอนของขบวนการตัดชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาจุลพยาธิสภาพของตัวอย่าง หรือไม่เช่นนั้นให้ทำลายพรีออนโดยใช้ 95% กรดฟอร์มิค (formic acid) ก่อนนำตัวอย่างไปตรวจทางจุลพยาธิ แม้ว่าจะไม่มีคำแนะนำสำหรับการปฏิบัติงานด้านพรีออนโดยตรง แต่ควรมีการระมัดระวังอันตรายอันจะเกิดจากอุบัติเหตุจากการได้รับพรีออนโดยการฉีดหรือกิน ควรหลีกเลี่ยงการใช้ของมีคมหรือของแหลมคม ถ้าไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ควรใช้ถุงมือป้องกัน เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ควรแยกใช้อุปกรณ์สำหรับงานพรีออน และมีกำหนดการล่วงหน้าสำหรับการปฏิบัติงานพรีออน มีการแยกใช้อุปกรณ์ป้องกันเฉพาะสำหรับบุคลากรบริเวณทางเข้าห้องปฏิบัติการ เช่น เสื้อกาวน์ (gown) หมวก อุปกรณ์ปิดจมูก และอื่นๆ ข้อปฏิบัติสำหรับการปฏิบัติงานพรีออนควรมีไว้ทั้งเป็นลายลักษณ์อักษร และประชาสัมพันธ์ให้เจ้าหน้าที่ทุกคนทราบ เช่น ข้อปฏิบัติต่างๆ สำหรับการลดการปนเปื้อนของอุปกรณ์ที่นำมาใช้ใหม่ หรือพื้นผิวบริเวณปฏิบัติงานและควรอยู่ในบริเวณปฏิบัติงาน

ข้อควรปฏิบัติสำหรับห้องปฏิบัติการวินิจฉัยหรือวิจัยพรีออน มีดังนี้

1. กำหนดทางเข้า-ออก เฉพาะผู้ปฏิบัติงานที่ได้รับการอบรม

2. ผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับพรีออน ควรได้รับการฝึกอบรมถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน โรคที่เกิดจากพรีออน การแพร่ระบาด และข้อปฏิบัติจำเพาะสำหรับพรีออน ซึ่งสามารถศึกษาถึงรายละเอียดเพิ่มเติมจากหนังสือ Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)

3. เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน ควรสวมถุงมือ เสื้อ

กาวน์ และอุปกรณ์ที่จำเป็น ขณะปฏิบัติงาน และหลังการปฏิบัติงาน ควรถอดอุปกรณ์ป้องกันทุกชนิด

4. ชิ้นส่วนของพรีออนทุกชนิด ควรอยู่ในบรรจุภัณฑ์ที่ปิดแน่นกันน้ำ และติดฉลากบ่งบอกด้วยสัญลักษณ์เตือนอันตราย (Biohazard) และวางบนภาชนะ เช่น ถาดที่มีสัญลักษณ์ เช่นเดียวกัน

5. การบดตัวอย่างโดยใช้คลื่นเสียง หรือการทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน ควรปฏิบัติในตู้ชีวนิรภัยระดับ 2 (Biosafety Cabinet, BSC Class II)

6. การทำความสะอาดเครื่องตัดชิ้นเนื้อหรือใบมีดตัดตัวอย่าง ควรมีอุปกรณ์ช่วยไม่ให้มือผู้ปฏิบัติสัมผัสใบมีด

7. ควรใช้แผ่นรองซับหรือถาดซึ่งใช้ครั้งเดียวทิ้ง เพื่อช่วยป้องกันการปนเปื้อน และฆ่าเชื้อพื้นผิวปฏิบัติงานได้ง่ายขึ้น

8. ข้อควรปฏิบัติในกรณีที่จำเป็นต้องนำวัสดุอุปกรณ์กลับมาใช้ใหม่ คือ อุปกรณ์ไม่ควรปล่อยให้แห้งก่อนทำความสะอาด ควรรีบทำความสะอาดอุปกรณ์ เพื่อป้องกันอุปกรณ์แห้งกรัง ควรแยกอุปกรณ์ที่ปฏิบัติการเกี่ยวกับพรีออนจากอุปกรณ์ที่ไม่เกี่ยวข้อง อุปกรณ์ที่ปนเปื้อนพรีออน ควรลดการปนเปื้อนก่อนนำมาล้างในเครื่องล้างอุปกรณ์ และเปิดเครื่องล้างโดยไม่ใส่อุปกรณ์ 1 ครั้ง ก่อนใช้เครื่องทุกครั้ง

9. ข้อแนะนำการลดการปนเปื้อนสำหรับของเสีย อุปกรณ์ที่ต้องนำกลับมาใช้ใหม่และพื้นผิวปฏิบัติการเกี่ยวกับพรีออน

9.1 ของเหลวควรปฏิบัติดังนี้

- ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1.0 Normal (N) และทิ้งไว้อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หรือ
- ผสมกับคลอรีน ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 20,000 ส่วนในล้านส่วน (part per million, ppm) ของคลอรีน และทิ้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง
- ของเสียควรอยู่ในตู้ดูดควัน (Chemical fume hood) ตลอดระยะเวลาการกำจัดของเสีย หลังจากนั้นทำให้เป็นกลาง และเทใส่ท่อระบายน้ำ หรือกำจัดทิ้งเช่นเดียวกับสารเคมีทั่วๆ ไป

9.2 พื้นผิวปฏิบัติงานปนเปื้อนพรีออน

- ใช้สารละลายคลอรีนความเข้มข้น 20,000 ส่วนในล้านส่วน เช็ดและทิ้งไว้เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง หรือ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ควรใช้น้ำทำความสะอาดอีกครั้ง

9.3 อุปกรณ์ปนเปื้อน

- จุ่มใน 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) (20,000 ส่วนในล้านส่วน) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำสะอาด นึ่งไอน้ำ (gravity displacement) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- จุ่มใน 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (20,000 ส่วนในล้านส่วน) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำสะอาด นึ่งไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 134 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (porous load)
- จุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 20,000 ส่วนในล้านส่วน หรือ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ นาน 1 ชั่วโมง

9.4 ขยะแห้งที่มีการปนเปื้อนควรทำการเผา ในกรณีวัสดุแหลมคมที่มีการ

ปนเปื้อน ให้ระบุว่าเป็นวัสดุแหลมคมปนเปื้อนสำหรับการเผา และติดต่อเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยทางชีวภาพช่วยเหลือในการกำจัดทิ้ง

10. ในกรณีมีการสัมผัสผิวหนัง ให้ทำการล้างด้วย 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 10% ของสารคลอรีน นาน 2–3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำจำนวนมากๆ สำหรับกรณีถูกเข็มแทง หรือผิวถลอก ให้ทำการบีบแผลเบาๆ ให้เลือดออกแล้วล้างด้วยน้ำสบู่อุ่นๆ ตามด้วยน้ำ ทำให้แผลแห้ง และปิดแผล ในกรณีเข้าตาให้ล้างด้วยน้ำ หรือน้ำเกลือจำนวนมากๆ และแจ้งเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทันที

11. ผู้ปฏิบัติงานหลักควรมีวิธีการดำเนินการสำหรับกรณีสารชีวภาพหกรั่วไหล หรือการสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนพรีออน และมีการรายงานต่อเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยทางชีวภาพทันที เพื่อดำเนินการป้องกันการเกิดเหตุการณ์ซ้ำขึ้นอีก

12. สำหรับการส่งผ่านตัวอย่างพรีออน เพื่อให้เป็นไปตามหลักสากลของการส่งผ่านตัวอย่างสารชีวภาพ ควรมีการศึกษาข้อมูลและใช้บริการการขนส่งซึ่งได้รับการอนุญาตให้ส่งผ่านเชื้ออันตรายเท่านั้น

ข้อสังเกตสำหรับน้ำยาฆ่าเชื้อ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 1 N) เมื่อทำปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide, CO_2) ในอากาศจะได้สารคาร์บอเนต (Carbonate) ซึ่งจะทำให้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นกลาง และลดคุณสมบัติในการทำลายเชื้อ แต่สำหรับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 10 N) จะไม่ทำปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นจึงควรเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 1 N) ใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง ซึ่งอาจจะเตรียมจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ชนิดเม็ด หรือจากสารตั้งต้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 10 N)

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (สารละลาย NaOCl หรือผงฟอกขาว) มีทั้งชนิดใช้ในครัวเรือน และชนิดใช้ในอุตสาหกรรมซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน แต่ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคลอรีนซึ่งควรจะมี 20,000 ส่วนในล้านส่วน

ตารางที่ 19.1 รายละเอียดโรคที่เกิดจากพรีออนในสัตว์ และระดับความปลอดภัยของห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยในการตรวจหรือวิจัยพรีออน

โรคที่เกิดจากพรีออน	โฮสต์ (Natural Host)	พรีออน	Pathogenic PrP Isoform	ระดับห้องปฏิบัติการชีวนิรภัย
โรคสแครปี	แกะ แพะ และ mouflon	Scrapie prion	$OvPrP^{Sc}$	2
Transmissible mink encephalopathy (TME)	ตัวมิ้งค์	TME prion	$MkPrP^{Sc}$	2
Chronic wasting disease (CWD)	ล่อ กวาง	CWD prion	$MdePrP^{Sc}$	2
Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	วัว ควาย	BSE prion	$BoPrP^{Sc}$	2 หรือ 3
Feline spongiform encephalopathy (FSE)	แมว	FSE prion	$FePrP^{Sc}$	2
Exotic ungulate encephalopathy (EUE)	ไนอาร่า ละมั่ง ออริกซ์	EUE prion	$UngPrP^{Sc}$	2

ที่มา: BMBL, 5th ed., 2007

เอกสารอ้างอิง/ References.

1. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories [online]. 1999 [cited 2010 May 10]. Available from: http://www.cdc.gov/od/ohs/ biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm
2. Frasier D, Talka J. Facility design considerations for select agent animal research. ILAR J 2005; 46:23-33.
3. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 7thed. Washington DC: National Academy Press; 1996.
4. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Occupational health and safety in the care and use of research animals, Washington DC: National Academy Press; 1997.
5. Richmond JY, Hill RH, Weyant RS, Nesby-O'Dell SL, Vinson PE. What's hot in animal biosafety?. ILAR J 2003; 44:20-7.
6. U.S. Department of Agriculture, Animal Research Services. ARS Facilities Design Standards [online]. 2002 [cited 2010 May 10]. Available from: http://www.afm.ars.usda.gov/ppweb/242-01m.htm